

Haracska, L. and Udvardy, A. (1995)
Cloning and sequencing a non-ATPase subunit
of the regulatory complex of the *Drosophila* 26S
protease. *Eur. J. Biochem.*, 231: 720–725.

A 26S PROTEASZÓMA POLIUBIKVITIN RECEPTOR ALEGYSÉGÉNEK KALANDOS AZONOSÍTÁSA

Haracska Lajos¹, Lipinszki Zoltán² és Udvardy Andor²

¹MTA SZBK, Genetikai Intézet, ²MTA SZBK, Biokémiai Intézet

Összefoglaló

A szabályozott intracelluláris proteolízis a sejt számára aktuálisan sürgős vagy káros fehérjék eltávolítását végzi. A proteolízis irreverzibilis változásokat hoz létre a sejtben, ami a folyamat szigorú szabályozottságát teszi szükségessé. Két független folyamat biztosítja a proteolízis szigorú szelektivitását. Az ubikvitinációs enzim kaszkád feladata a bontásra szánt fehérjékben található „degradációs szignálok” felismerése és egy specifikus poszttranszlációs módosítással, a poliubikvitinációval a fehérjék bontásra történő kijelölése. A 26S proteaszóma, az intracelluláris fehérje bontást végző multiprotein enzim komplexum felismerni képes a poliubikvitin láncot, mint bontási szignált, megköti és egy többlépcsős folyamat végeredményeként lebontja a kijelölt fehérjét. A 26S proteaszóma első, és talán legfontosabb feladata a poliubikvitin lánc felismerése és megkötése, így rendelkeznie kell egy olyan alegységgel, amely poliubikvitin receptorként funkcionál. Ennek az alegységnek az azonosítása egy sok éves, kalandos történet. Kezdeti gyors sikernek számított, hogy *in vitro* kötési teszttel magasabbrendű eukariótákban, majd élesztőben is azonosítottak egy alegységet, amely kielégítette egy poliubikvitin receptorral szemben felállított kritériumokat. Problémát jelentett azonban, hogy az élesztő ortológ deléciója nem eredményezett letalitást és a poliubikvitinált fehérjék *in vivo* felhalmozódását – amit a poliubikvitin receptor deléciójától elvártak. Ezek alapján rögtön elvetették még azokat a pozitív eredményeket is, melyeket más eukarió-

ta ortológok tanulmányozásával nyertek és a továbbiakban 6 év kemény munkája kellett annak bizonyítására, hogy a korábban azonosított 26S proteaszóma alegység valamennyi eukariótában poliubikvitin receptorként funkcionál. *Drosophila melanogaster*ben végzett *in vivo* és *in vitro* munkáink ehhez a bizonyítási folyamathoz szolgáltatott új eredményeket.

Poliubikvitinált fehérjék szabályozott lebontása

A sejtek homeosztázisát több különböző, de egymással kölcsönható szabályozó rendszer biztosítja. A legrégebben, és talán legrészletesebben tanulmányozott rendszer a gén-expresszió transzkripcionális szintű szabályozása volt. A fehérjék intracelluláris irányított lebontásának felismerése a múlt század utolsó évtizedében nagymértékben tágította, és újabb szintre, a fehérjék szintjére terjesztette ki ismereteinket a homeosztázis fenntartásáért, és flexibilitásának biztosításáért felelős szabályozási rendszerek sorában. A proteolitikus szabályozás jelentőségét, a biológiai rendszerekben megismert számos reverzibilis regulációs mechanizmussal ellentétesen, irreverzibilis volta határozza meg. A fehérje lebontását követően a folyamatok iránya egyértelműen, visszafordíthatatlanul meghatározottá válik. Számos példa bizonyítja ennek jelentőségét a sejtciklus szabályozásában. A fehérjék lebontását kísérő változások irreverzibilitása természetesen azt igényli, hogy a bontási folyamat rendkívül szigorúan szabályozott legyen, kizárólag csak azokat a fehérjéket érintse, melyek eltávolítása a sejt pillanatnyi homeosztázisa szempontjából elengedhetetlen. E szigorú specifikitási feltétel biztosítása érdekében a bontandó fehérje kiválasztását, illetve magát a proteolízis folyamatát két különböző, független rendszer végzi. Az ubikvitinációs enzim kaszkád feladata a bontásra szánt fehérjékben található „degradációs szignálok” felismerése, és ezen fehérjék bontásra történő kijelölése egy specifikus poszttranszlációs módosítással. E módosítás során a bontandó fehérje egy lizin aminosav oldalcsoportjához az enzim kaszkád poliubikvitin láncot szintetizál, amely felismerési jelként szolgál a fehérje bontást végző speciális proteolitikus komplex, a csaknem 50 alegységből felépülő 2,4 MDa nagyságú 26S proteaszóma számára. A szabályozott intracelluláris prote-

olízis specificitását tehát a 26S proteaszóma azon képessége biztosítja, hogy szelektíven csak a poliubikvitinált fehérjéket bontja, tehát egyik – talán legfontosabb – szerepe a poliubikvitinált fehérjék felismerése, megkötése és proteolitikus processzálása.

A 26S proteaszóma poliubikvitin receptorának azonosítása

Az 1990-es évek elején nagyon éles verseny alakult ki több vezető amerikai és európai laboratórium között a 26S proteaszóma szerkezetének, és poliubikvitinált fehérje-felismerő mechanizmusának megismerése terén. Három publikációnkkal kapcsolódtunk be ennek a kérdésnek a megközelítésébe. Sikerült homogenitásig tisztítani a 26S proteaszómát ecetmuslicából (*Drosophila melanogaster*), meghatározni pontos alegységösszetételét, igazolni poliubikvitinált fehérje-bontó képességét és kimutatni két alkomplexumának ATP-függő *in vitro* összeszerelődését [1]. Ezt követően klónoztuk és molekulárisan jellemeztük egyik alegységét [2], melyről később bizonyítottuk, hogy a 26S proteaszóma poliubikvitin receptora, a komplexumnak azon alegysége, mely szelektíven képes felismerni és megkötni a poliubikvitinált fehérjéket, és e kötés affinitása a poliubikvitin láncot alkotó ubikvitin egységek számával arányosan nő [3]. Deléciós térképezéssel behatároltuk az alegység azon szakaszait is, melyek a poliubiquitin lánc felismerésében és kötésében részt vesznek.

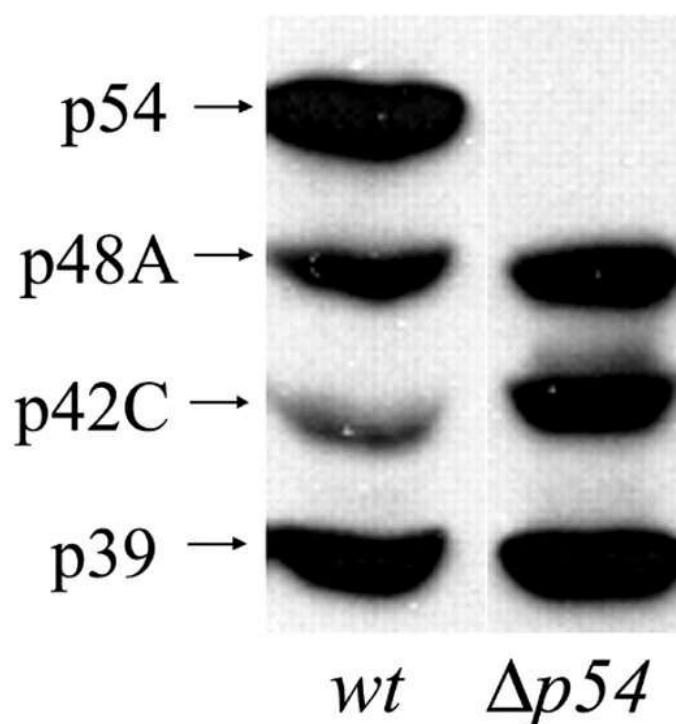
A 26S proteaszóma poliubikvitin receptor alegységét *in vitro* kötési teszttel több eukarióta fajban azonosították (S5a/Rpn10/p54 a humán/élesztő/*Drosophila* ortológok). Ezek az alegységek magas fokú szekvencia homológiát mutattak [4], ennek ellenére fiziológiás szerepüket kérdésessé tette az a megfigyelés, hogy élesztőben az Rpn10-t kódoló gén deletálása nem letális és nem eredményezi a poliubikvitinált fehérjék felhalmozódását [5]. A megfigyelésből a Harvard Egyetem kutatói arra a következtetésre jutottak, hogy vagy a poliubikvitin lánc kötésének kimutatására alkalmazott *in vitro* kötési tesztek aspecifikus kötést detektáltak, vagy pedig léteznek más, nagyobb affinitású poliubikvitin receptorok, melyek *in vivo* képesek komplementálni ennek a fehérjének a funk-

cióját. Az extraproteasómális ubiquitin receptorok felfedezése feloldani látszott ezt a problémát. Ezek a fehérjék (Rad23, Dsk2 és Ddi1) hordoznak egy UBA domént, mely a poliubikvitin lánc szelektív felismeréséért és megkötéséért felelős, valamint egy UBL domént, mely a 26S proteasómahoz kötődve lehetővé teszi a szállított poliubikvitinált fehérje proteasómális betáplálását és lebontását. Rad23 Δ és Dsk2 Δ deléciós élesztő mutánsokban a poliubikvitinált fehérjék nagyfokú felszaporodását észlelték [6], melyet annak megerősítésekként tekintettek, hogy nem az Rpn10 alegység, hanem ezek az extraproteasómális fehérjék működnek poliubikvitin receptorként. A Harvard Egyetem egy laboratóriumából közölt eredmény évekre felfüggesztette a 26S proteasóma ezen alegységének funkcionális vizsgálatát. Ha lassan is, de gyűltek az adatok, melyek a Harvard kutatóinak tekintélyét lebontva, kizárólag a tudományos tények alapján lehetővé tette a proteasóma ubiquitin receptor alegységének azonosítását és működésének tisztázását: a Rad23 Δ élesztő mutáns sejtekhez viszonyítva a Rad23 Δ Rpn10 Δ kettős mutáns élesztő sokkal súlyosabb pleiotróp fenotípusa azt sugallta, hogy az Rpn10 fehérje részt vesz a Rad23 által prezentált poliubikvitinált fehérjék proteasómális processzáálásában [7]. Végül az élesztő 26S proteasóma proteolitikus funkciójának tisztított komponensekből történő *briliáns in vitro* rekonstrukciójával Verma és mtsai egyértelműen bizonyították, hogy az Rpn10 alegység valóban poliubikvitin receptorként működik élesztőben [8].

Poliubikvitin receptor funkciót alátámasztó *Drosophila* genetikai bizonyítékok

Az élesztő Rpn10 deléciós mutáns fenotípusának hibás értelmezése azért meglepő, mert az Rpn10 és magasabb eukarióta ortológjainak szekvenciája korábban már ismert volt. A szekvencia adatokból nyilvánvaló volt, hogy bár az Rpn10 magas fokú szekvencia homológiát mutat a magasabb eukarióta ortológokkal, az alegység azonban lényegesen rövidebb, a C-terminálisáról hiányzik egy jelentősen hosszú, magasabbrendű eukariótákban nagymértékben konzerválódott szakasz.

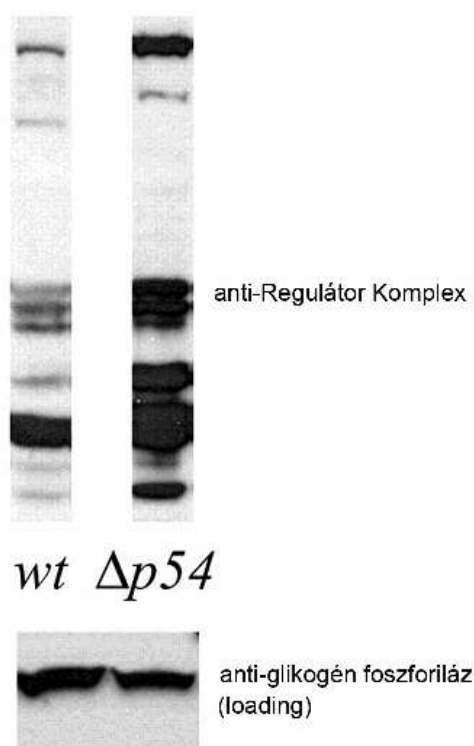
Ezeknek a szekvencia adatoknak ismeretében további vizsgálatainkban feltételeztük, hogy az élesztő deléciós mutáns nem nyújthat teljes információt az S5a vagy a p54 tényleges funkciójáról. Annak bizonyítására, hogy a *Drosophila* p54 alegység valóban a 26S proteaszóma poliubikvitin receptora, konstruáltunk egy p54 Δ deléciós mutánst (1. ábra).



1. ábra. A 26S proteaszóma regulátor komplexum p54 alegységének detektálása vad típusú és p54 Δ deléciós *Drosophila* törzsekben. Vad típusú (wt) ill. p54 Δ *Drosophila* lárvákból készített teljes fehérje kivonatot 8%-os SDS-PAGE-en szeparáltuk, majd 4 különböző regulátor komplex specifikus monoklonális ellenanyaggal immunoblotos technikával vizsgáltuk.

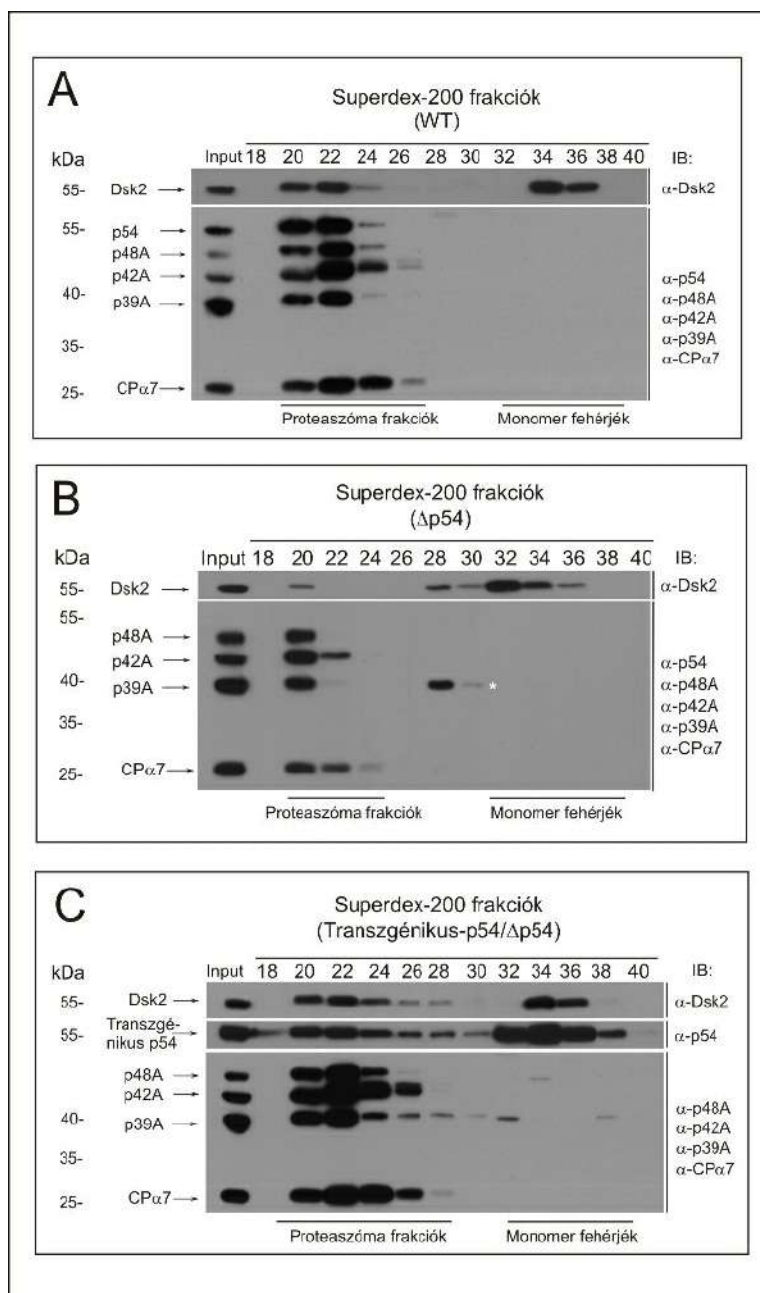
Várakozásunknak megfelelően a deléciós mutáns azt a fenotípust mutatta, amit egy esszenciális poliubikvitin receptor deléciós mutánstól elvárhatunk: a deléció mitotikus hibákat, fejlődési rendellenességeket és korai báb letalitást, valamint a poliubikvitinált fehérjék nagyfokú felszaporodását eredményezte [9]. Vizsgálataink, Verma és mtsai egy évvel később élesztőben végzett *in vitro* kísérleteivel együtt nyugvó pontra juttatták a 26S proteaszóma poliubikvitin receptor azonosításának kalandos útját. A tudomány legnagyobb ereje, hogy a tekintély erejével szemben is önkorrekcióra képes.

A deléció váratlan és érdekes következménye volt a csaknem 50 proteaszómális alegység koordinált, extrém fokú túltermelődése (2. ábra).



2. ábra. A 26S proteaszóma nagyfokú túltermelődést mutat $p54\Delta$ deléciós *Drosophila* törzsben. Egyetlen 20 órás vad típusú (wt), illetve $p54\Delta$ deléciós báb teljes fehérje extraktumában a 26S proteaszóma katalitikus és regulátor komplexum alegységeinek immunoblotos detektálása. Alsó panel: glikogén foszforiláz (bemérési kontroll).

A túltermelődött alegységek összeszerelődtek egy defektív 26S proteaszóma partikulummá, amelyből csak a p54 alegység hiányzott. A túltermelődés koordináltságát az bizonyította, hogy szabad proteaszómális alegységet a deléciós mutánsban kimutatni nem lehetett, valamennyi alegység fehérje 26S proteaszóma partikulummá összeszerelt állapotban volt jelen a deléciós mutánsban. Ez a koordináltság azért is érdekes, mert az alegységeket kódoló gének a *Drosophila* genom legkülönbözőbb pontjain helyezkednek el. A jelenség pontos mechanizmusa mindmáig ismeretlen.



3. ábra. A Dsk2 csak a p54 jelenlétében kötődik a proteasómához. A) Gélszűrési-kromatográfiával (Superdex 200) igazoltuk, hogy a vad típusú (WT) bábokban a Dsk2 egy része a proteasómához kötődik (fr. 20-24), míg a többi extraproteasómálisan halmozódik fel (fr. 34-36). **B)** Δp54-es állatokban a Dsk2 csak nyomokban mutatható ki a proteasómában. **C)** A transzgénikus p54, amely beépül a Δp54-es proteasómába a Dsk2 újbóli proteasómális kötődését hozza létre. IB – immunoblot a következő ellenanyagokkal: anti-Dsk2, anti-p54, anti-p48A, anti-p42A és anti-p39A (a 19S regulátor komplexum alegységei), anti-CPα7 (a 20S katalitikus mag alfa alegysége).

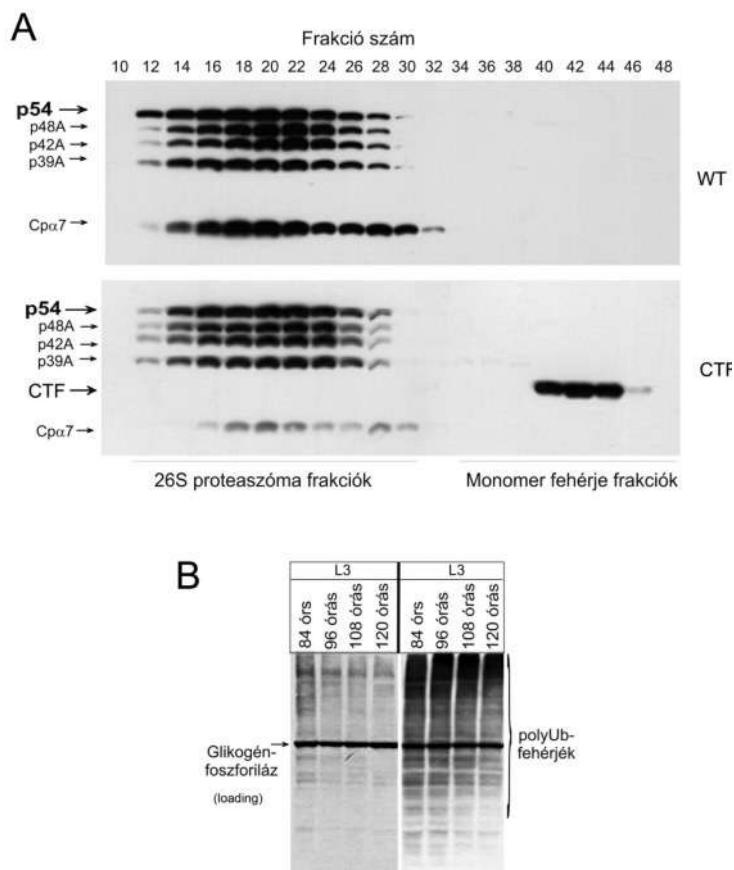
A p54 alegység esszenciális poliubikvitin receptor funkciójának igazolása után részletesen vizsgáltuk az extraproteasómális ubiquitin receptorok kölcsönhatásait a 26S proteasómával, ezen belül is a p54 alegységgel, és ezeknek a

kölcsönhatásoknak szabályozását. Ha ecetmuslicában RNAi technikával a Dsk2 poliubikvitin receptor szintjét csökkentettük vagy transzgénikus állatokban túltermeléssel növeltük a poliubiquitinált fehérjék felhalmozódását figyeltük meg és az állatok bábstádiumban elpusztultak, ami a Dsk2 esszenciális szerepét bizonyítja [10]. Tehát szemben az élesztő sejtekkel, magasabb eukariótákban a poliubiquitin receptorok nem képesek komplementálni egymás funkcióit, valamennyi poliubikvitin receptor specifikus szubsztrát garnitúrával rendelkezik, melyek proteaszómális processzálásáért kizárólagosan felelősek. *In vitro* fehérje-fehérje kölcsönhatási kísérletekben kimutattuk, hogy a proteaszómális p54 alegység fizikai kölcsönhatásba lép a Dsk2 UBL doménjével, amit később transzgénikus állatokkal végzett kísérletekkel *in vivo* is igazoltunk. A várakozásnak megfelelően a Dsk2 és a 26S proteasóma kölcsönhatása p54 Δ deléciós mutáns törzsben nem mutatható ki. Ha a p54 Δ háttéren transzgénikus p54-et termeltettünk, a transzgénikus fehérje beépült a proteaszómába, és ezzel együtt az endogén Dsk2 ismét képes volt kölcsönhatást kialakítani a 26S proteaszómával (3. ábra) [10]. Ennek ismeretében kijelenthetjük, hogy a *Drosophila* Dsk2 a p54-en alegységen keresztül kapcsolódik a proteaszómához, a p54 alegységen keresztül tudja az általa szállított poliubikvitinált fehérjét a proteaszómának proteolitikus lebontásra átadni. Ez a mechanizmus szöges ellentétben áll az élesztőben megfigyelttel, ahol a Dsk2 és az Rpn10 versengenek egy közös proteaszómális kötőhelyért [11].

A poliubikvitin receptor szabályozása

Az élesztő és a magasabb eukarióta sejtek poliubikvitinált fehérjeprocesszási mechanizmusában kimutatott alapvető különbségek további vizsgálatánál abból a megfigyelésből indultunk ki, hogy proteaszómális poliubikvitin receptorjaik (p54 ortológok) között a lényeges különbség e fehérjék C-terminális részében van. Ezért célszerűnek látszott megvizsgálni a p54 alegység C-terminális felének kölcsönhatásait az extraproteaszómális poliubikvitin receptorokkal, valamint e kölcsönhatások szabályozási mechanizmusait.

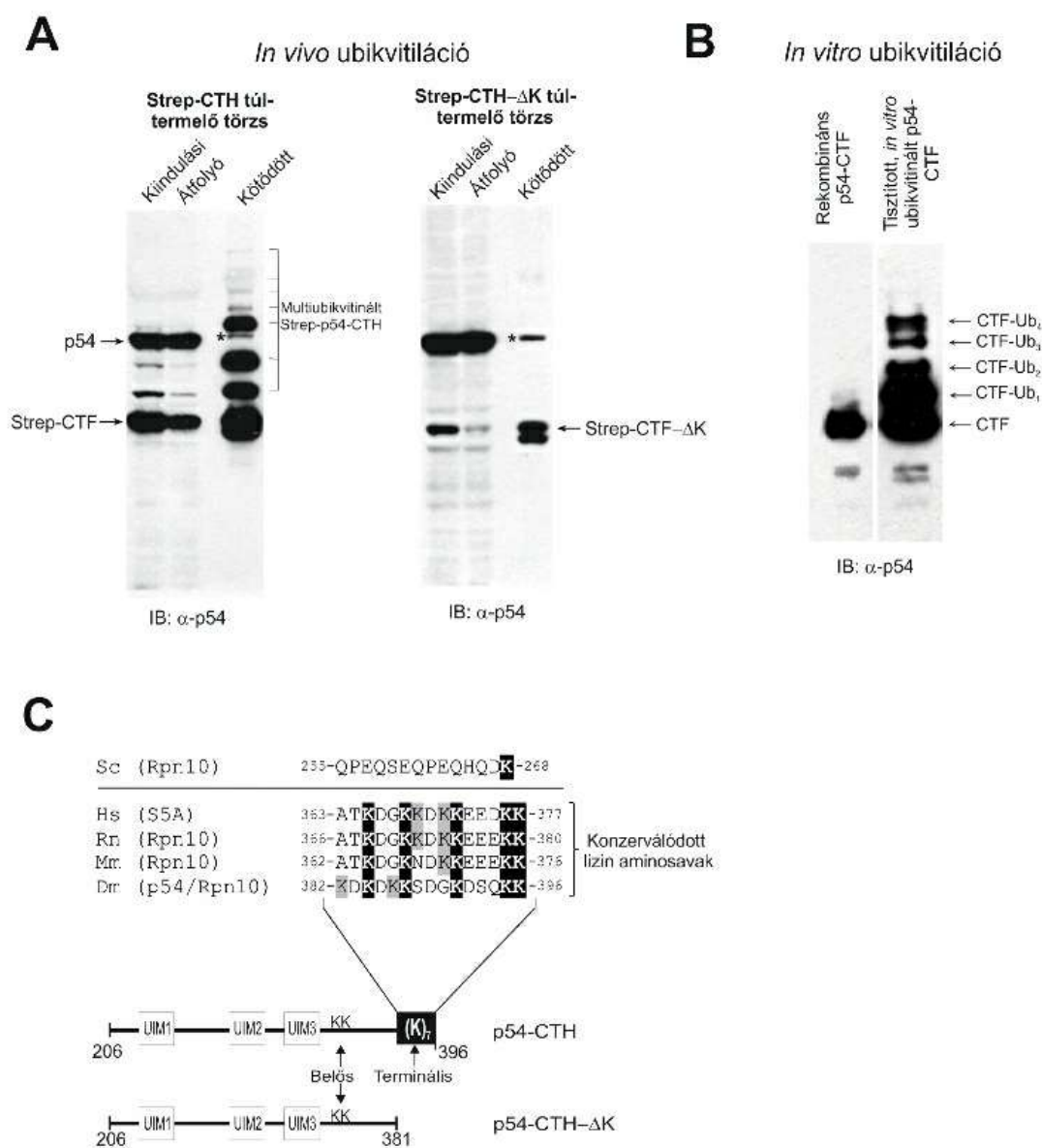
A p54 fehérje N-terminális felében lévő vWA domén felelős az alegységnek a 26S proteasóma-hoz történő kapcsolódásáért, ezért olyan transzgénikus *Drosophila* törzset konstruáltunk, amelyben a p54 C-Terminális Felét (CTF) lehet túltermeltetni.



4. ábra. A transzgénikusan túltermeltetett p54-CTF fehérje nem kötődik a proteasóma-hoz és a poliubikvitinált fehérjék nagyfokú felhalmozódását idézi elő. A) Vad típusú (WT) és CTF transzgénikus lárvák teljes fehérje extraktumát Superose 6 FPLC oszlopon frakcionáltuk. A 26S proteasóma alegységeit immunoblotos technikával detektáltuk. **B)** Poliubikvitilált fehérjék felhalmozódását a CTF transzgénikus lárvákban anti-ubikvitin ellenanyaggal detektáltuk.

Várakozásunknak megfelelően ez a fehérje nem kapcsolódott a 26S proteasóma-hoz, extraproteasómálisan halmozódott fel, a poliubikvitinált fehérjék nagyfokú felszaporodását eredményezte, és az állatok lárvastádium végi pusztulását okozta (4. ábra). Affinitás-kromatográfiával tisztított transz-génikus CTF tömegspektrometriai elemzése kimutatta, hogy a CTF *in vivo* ubikvitilálódik, amit *in vitro* is sikerült reprodukálnunk [12]. A CTF-ben található egy, a magasabbrendű eukariótákban konzerválódott, terminálisan elhelyezkedő lizin csoport (5. ábra). Ha ezeket a lizineket eltávolítottuk és az így csonkolt fehérje

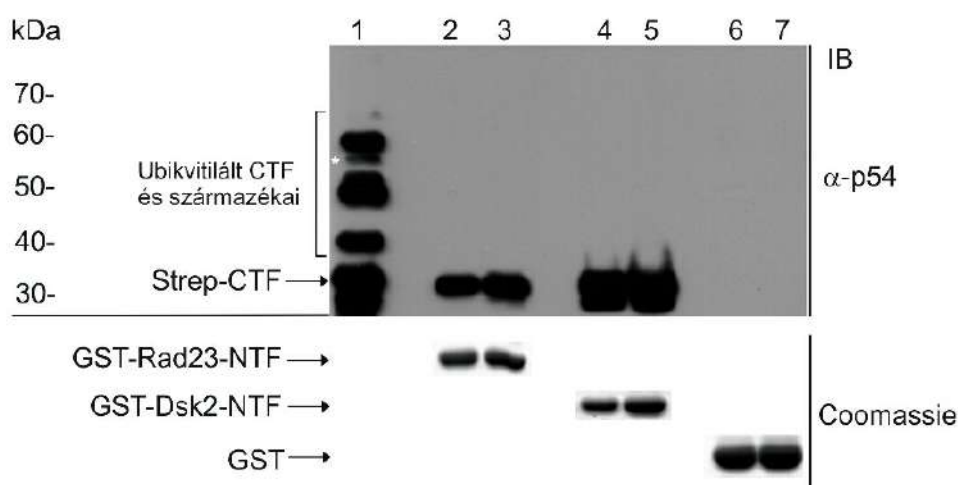
expressziójára készítettünk transzgénikus *Drosophilát* (CTF-ΔK), a transzgénikus fehérjében ubikvitilációt nem lehetett kimutatni, tehát az ubikvitiláció a terminális lizin oldalcsoportokon alakul ki.



5. ábra. Transzgénikus CTF *in vivo* multiubikvitinált, *in vitro* multiubikvitinálható. A) Strep-oszlopon tisztított p54-CTH fehérjén a módosítás a C-terminális lizin oldalcsoportokon alakul ki, ami a CTF-ΔK fehérjén nem alakul ki. **B)** Rekombináns p54-CTF-et *Drosophila* embrió extraktumban inkubálva a CTF posztisztetikus módosítása *in vitro* is kialakul. **C)** A multiubikvitináció a p54 terminális, magasabbrendű eukariótákban konzerválódott lizin oldalcsoportjain alakul ki.

Bizonyítottuk, hogy a p54 C-terminális lizinjein multiubikvitiláció (több lizin oldalcsoport egyidejű monoubiquitinációja) történik, és ez a módosítás – szem-

ben a poliubikvitinációval - nem degradációs jel; az ubiquitilált CTF féléletideje ugyanis több mint 2 nap. Fehérje-fehérje kölcsönhatási kísérleteink azt igazolták, hogy az ubikvitilált CTF nem képes kapcsolódni a Dsk2 UBL doménjéhez, a módosítás gátolja a két fehérje közti interakciót, tehát ez a poszttranszlatív módosítás regulációs szerepű (6. ábra). A módosítás nemcsak a p54 fehérje CTF-ben alakul ki, teljes hosszúságú p54-et termelő transzgénikus törzsekben hasonlóan kimutatható, s itt is a terminális lizinek multiubikvitilációja következik be, viszont a módosított formák soha nem épülnek be a proteasómába, kizárólag extraproteasómálisan halmozódnak fel (7. ábra).

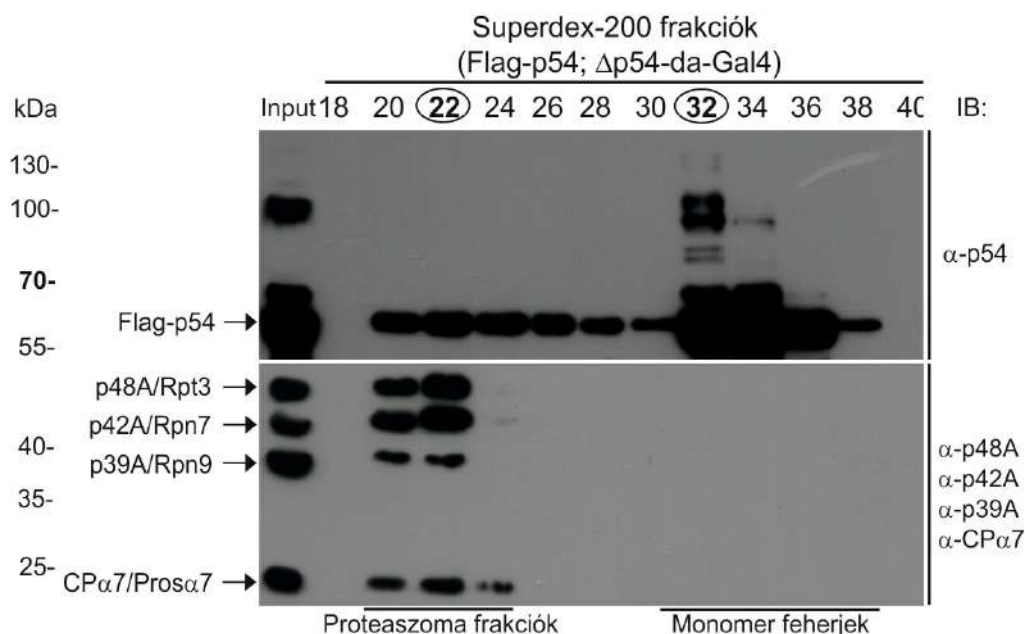


6. ábra. A CTF multiubikvitilálása felfüggeszti a Rad23 és Dsk2 extraproteasó-mális poliubikvitin receptorok CTF-lel történő kölcsönhatását. Tisztított Strep-CTF és multiubikvitinált származékait affinitás oszlopokhoz kötött GST-Rad23, illetve GST-Dsk2 fehérjékkel (azok N-terminális felével (NTF)) inkubáltuk. Az affinitás oszlophoz kötődő CTF származékokat eluáltuk és immunoblot technikával azonosítottuk. Csak a módosítatlan CTF kötődött a Rad23, illetve Dsk2 fehérjékhez.

Ez a megfigyelés is a multiubikvitiláció szabályozó szerepét bizonyítja. Ezeknek a csak magasabb eukariótákban megtalálható terminális, konzerválódott lizin oldalcsoportoknak fontos vitális szerepük van. Vizsgálataink szerint a *Drosophila* p54 Δ deléciós törzs letális fenotípusát tökéletesen menekíteni lehet, ha transzgénikus p54 fehérjét fejeztetünk ki a mutáns háttéren.

A transzgénikus p54 fehérje beépül a 26S proteasómába és komplementálja a poliubikvitinált fehérjék felhalmozódását és a letális fenotípust. Olyan transzgénikus p54 fehérje, amelyből a terminálisan elhelyezkedő, konzerválódott lizin

oldalcsoportokat tartalmazó utolsó 14 aminosavat eltávolítottuk, beépül ugyan a 26S proteasómába, kölcsönhatásba lép a Dsk2-vel, de nem képes teljesen komplementálni az endogén p54 funkcióját [13].



7. ábra. Transzgénikus p54 fehérje in vivo multiubikvitilálódik, de a poszttranszlatív módon módosított formái nem épülnek be a 26S proteasómába. p54Δ deléziós mutánsban transzgénikus p54 fehérjét (Flag-p54) termeltettünk, a teljes lárvális fehérje extraktumot Superdex 200 FPLC oszlopon frakcionáltuk és a proteasómába beépült, illetve extraproteasómális p54 fehérjéket immunoblotos technikával azonosítottuk.

Emiatt az állatok elpusztulnak. Laboratóriumunkban jelenleg a terminális lizin oldalcsoportok ezen esszenciális funkciójának molekuláris elemzése folyik.

Köszönetnyilvánítás

Munkánkat a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal (OTKA-PD115404), a Nemzetgazdasági Minisztérium (GINOP-2.3.2-15-2016-00001, GINOP-2.3.2-15-2016-00032 és GINOP-2.3.2-15-2016-00020), valamint az MTA támogatja (Bolyai János Kutatási Ösztöndíj).



Haracska Lajos, molekuláris biológus, az MTA SZBK Biokémiai Intézetében Udvardy Andor témavezetésével védte meg Ph.D. dolgozatát fehérje ubikvitiláció és szabályozott lebontás témakörben. Posztdoktorként többek között az USA-ban a UTMB-n az ubikvitiláció DNS hibajavításban betöltött szerepét tanulmányozta. Jelenleg az SZBK Genetikai Intézetében vezetője a Mutagenesis és Karcinogenesis Kutatócsoportnak, amely az elmúlt években több új, a DNS hibatoleranciában szerepet játszó ubikvitin-ligáz és ubikvitin-kötő fehérje szerepét tárta fel.



Lipinszki Zoltán a Szegedi Tudományegyetemen szerzett biológus diplomát 2006-ban, majd az MTA SZBK Biokémiai Intézetében Udvardy Andor csoportjában védte meg Ph.D. dolgozatát a poliubikvitin receptorok jellemzése és szabályozása témakörben 2009-ben. FEBS posztdoktori ösztöndíjjal 4 évet töltött a Cambridge-i Egyetemen, ahol David Glover témavezetésével a sejtosztódás szabályozásában résztvevő fehérje módosítások regulációs szerepét vizsgálta. 2015 óta tudományos főmunkatárs, az SZBK Biokémiai Intézetében a Sejtciklus és Transzkripció Szabályozás Csoport vezetője. Kutatási témája a mitózis irányítását végző ubiquitilációs és foszforilációs folyamatok feltárása.



Udvardy Andor a Budapesti Orvostudományi Egyetemen 1962-ben orvosi diplomát, az Eötvös Lóránd Tudományegyetemen 1968-ban pedig matematikusi diplomát szerzett. 1971 óta az MTA SZBK kutatója. 1974-ben nyerte el a kandidátusi fokozatot, 1987-ben a tudományok doktora címet. 1989-től az EMBO tagja. Tanulmányúton járt Marburgban, Göttingenben és Princetonban. Kutatási területe a molekuláris biológia, különös tekintettel a génexpresszió, a kromatin szerkezete és a fehérjebontás szabályozása.

Irodalomjegyzék

- [1] Udvardy, A. (1993) Purification and characterization of a multiprotein component of the Drosophila 26 S (1500 kDa) proteolytic complex. *The Journal of Biological Chemistry*, **268** (12): 9055-62.
- [2] Haracska, L., Udvardy, A. (1995) Cloning and sequencing a non-ATPase subunit of the regulatory complex of the Drosophila 26S protease. *Eur J Biochem*, **231** (3): 720-5.
- [3] Haracska, L., Udvardy, A. (1997) Mapping the ubiquitin-binding domains in the p54 regulatory complex subunit of the Drosophila 26S protease. *FEBS Letters*, **412** (2): 331-6.
- [4] Ferrell, K., Deveraux, Q., van Nocker, S., Rechsteiner, M. (1996) Molecular cloning and expression of a multiubiquitin chain binding subunit of the human 26S protease. *FEBS Letters*, **381** (1-2): 143-8.

- [5] vanNocker, S., Sadis, S., Rubin, D.M., Glickman, M., Fu, H.Y., Coux, O., Wefes, I., Finley, D., Vierstra, R.D. (1996) The multiubiquitin-chain-binding protein Mub1 is a component of the 26S proteasome in *Saccharomyces cerevisiae* and plays a nonessential, substrate-specific role in protein turnover. *Molecular and Cellular Biology*, **16 (11)**: 6020-6028.
- [6] Wilkinson, C.R., Seeger, M., Hartmann-Petersen, R., Stone, M., Wallace, M., Semple, C., Gordon, C. (2001) Proteins containing the UBA domain are able to bind to multi-ubiquitin chains. *Nature Cell Biology*, **3 (10)**: 939-43.
- [7] Lambertson, D., Chen, L., Madura, K. (1999) Pleiotropic defects caused by loss of the proteasome-interacting factors Rad23 and Rpn10 of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **153 (1)**: 69-79.
- [8] Verma, R., Oania, R., Graumann, J., Deshaies, R.J. (2004) Multiubiquitin chain receptors define a layer of substrate selectivity in the ubiquitin-proteasome system. *Cell*, **118 (1)**: 99-110.
- [9] Szlanka, T., Haracska, L., Kiss, I., Deak, P., Kurucz, E., Ando, I., Viragh, E., Udvardy, A. (2003) Deletion of proteasomal subunit S5a/Rpn10/p54 causes lethality, multiple mitotic defects and overexpression of proteasomal genes in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Cell Science*, **116 (Pt 6)**: 1023-33.
- [10] Lipinszki, Z., Pal, M., Nagy, O., Deak, P., Hunyadi-Gulyas, E., Udvardy, A. (2011) Overexpression of Dsk2/dUbqln results in severe developmental defects and lethality in *Drosophila melanogaster* that can be rescued by overexpression of the p54/Rpn10/S5a proteasomal subunit. *The FEBS Journal*, **278 (24)**: 4833-44.
- [11] Matiuhin, Y., Kirkpatrick, D.S., Ziv, I., Kim, W., Dakshinamurthy, A., Kleifeld, O., Gygi, S.P., Reis, N., Glickman, M.H. (2008) Extraproteasomal Rpn10 restricts access of the polyubiquitin-binding protein Dsk2 to proteasome. *Molecular Cell*, **32 (3)**: 415-25.
- [12] Lipinszki, Z., Kiss, P., Pal, M., Deak, P., Szabo, A., Hunyadi-Gulyas, E., Klement, E., Medzihradszky, K.F., Udvardy, A. (2009) Developmental-stage-specific regulation of the polyubiquitin receptors in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Cell Science*, **122 (Pt 17)**: 3083-92.
- [13] Lipinszki, Z., Kovacs, L., Deak, P., Udvardy, A. (2012) Ubiquitylation of *Drosophila* p54/Rpn10/S5a regulates its interaction with the UBA-UBL polyubiquitin receptors. *Biochemistry*, **51 (12)**: 2461-70.